

ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΕ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**Γ. Πενλόγλου¹, Γ. Γιαννόπουλος¹, Α. Παύλου¹, Κ. Κυπαρισσίδης^{1,2,*}**¹ Ινστιτούτο Χημικών Διεργασιών και Ενεργειακών Πόρων (ΙΔΕΠ), Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ), Θεσσαλονίκη, Ελλάδα² Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), Θεσσαλονίκη, Ελλάδα(* costas.kiparissides@cperi.certh.gr)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Σύμφωνα με την ιεραρχία διαχείρισης αποβλήτων, η επαναχρησιμοποίηση τους ως πρώτη ύλη για την παραγωγή νέων προϊόντων αποτελεί την πλέον επιθυμητή επιλογή, μετά την πρόληψη ή ελαχιστοποίηση τους. Οι βιοχημικές και βιολογικές διεργασίες μετατροπής, ως οι πλέον ήπιες και περιβαλλοντικά φιλικές, αποτελούν την ενδεδειγμένη επιλογή για την ιεράρχηση τους στην κορυφή των επιλογών διαχείρισης αποβλήτων. Έτσι, σε πλήρη συμφωνία με τον Ευρωπαϊκό στρατηγικό στόχο για μια κυκλική οικονομία μηδενικών αποβλήτων, η παρούσα εργασία πραγματεύεται την ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών και οικονομικά βιώσιμων διεργασιών βιομετατροπής αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων σε βιοπλαστικά προϊόντα. Ειδικότερα, δίνεται έμφαση στην αξιοποίηση υγρών ρευμάτων αποβλήτων από την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων (ορός τυρογάλακτος) για τη σύνθεση πλήρως βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών (πολύ-ύδροξυ-αλκανοϊκών εστέρων, PHAs), με εφαρμογές σε συσκευασίες τροφίμων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια οι περισσότερες χώρες και ιδιαίτερα τα κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν θέσει ως στόχο τη μερική ή ακόμα και την πλήρη αντικατάσταση των συνθετικών πλαστικών από βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, τα οποία μπορούν να βελτιώσουν τις δυσμενείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις των πρώτων. Τα PHAs είναι μια κατηγορία βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών που παράγονται ενδοκυτταρικά από διάφορα είδη βακτηρίων, ως αποθεματικά άνθρακα και ενέργειας ^[1]. Παρουσιάζουν εξαιρετικά χαρακτηριστικά βιοαποικοδομησιμότητας, βιοσυμβατότητας και μηδενικής τοξικότητας και παράγονται από ανανεώσιμες πηγές (π.χ., σακχαρόζη, γλυκερόλη, ζαχαροκάλαμο, άμυλο, τυρόγαλα) ^[2]. Επιπλέον, παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με αυτές των πετρελαϊκής προέλευσης πολυμερών. Ανάλογα με τις μοριακές ιδιότητες και τη σύσταση τους (π.χ., κατανομή μοριακού βάρους, MWD, κατανομή σύστασης συμπολυμερούς, CCD), μπορούν να προκύψουν διαφορετικές ποιότητες PHAs με αντίστοιχες τελικές ιδιότητες (π.χ., αντοχή σε θραύση, ανθεκτικότητα, ρεολογικές ιδιότητες, ιξώδες, ελαστικότητα) ^[3]. Επί του παρόντος, η ευρεία εφαρμογή και εμπορευματοποίηση των PHAs ως πλαστικά προϊόντα καθίσταται δύσκολη κυρίως λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής τους σε σύγκριση με τα συνθετικά πολυμερή, καθώς επίσης και λόγω της έλλειψης συγκεκριμένων στρατηγικών βελτιστοποίησης της παραγωγής με υψηλό ρυθμό και ελεγχόμενες ιδιότητες ^[4].

Γενικά, η ποσότητα (η απόδοση παραγωγής) και η ποιότητα (οι ιδιότητες) του τελικού προϊόντος, κατά τη βακτηριακή παραγωγή PHAs, εξαρτώνται από μια σειρά παραμέτρων που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη στρατηγική καλλιέργειας (ασυνεχής ή ημι-συνεχής λειτουργία), τις συνθήκες τροφοδοσίας (σύσταση μέσου καλλιέργειας, σύσταση μέσου τροφοδοσίας, συγκέντρωση ιχνοστοιχείων, ιοντική ισχύς, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, D.O.) και τις συνθήκες λειτουργίας (θερμοκρασία, pH, χρόνος συγκομιδής) ^[5,6].

Στην παρούσα μελέτη, διερευνάται η MWD σε διαφορετικές ποιότητες PHAs που παράγονται κατά την καλλιέργεια του *Azohydromonas lata* υπό διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης και με τη χρήση ρευμάτων παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων (υδρολύματα τυρογάλακτος). Συγκεκριμένα, εκτιμώνται οι επιδράσεις της σύστασης του μέσου καλλιέργειας, της συγκέντρωσης του D.O., της

ασυνεχούς ή ημι-συνεχούς λειτουργίας, του χρόνου συγκομιδής των κυττάρων και της στρατηγικής προσθήκης θρεπτικών συστατικών, στη MWD των παραγόμενων PHAs.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το βακτήριο *A. lata* (DSM 1123) χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την ενδοκυτταρική παραγωγή PHAs και συγκεκριμένα του πολύ-3-ύδροξυ-βουτυρικού εστέρα (PHB). Αυτό το άγριου-τύπου βακτήριο είναι εξαιρετικό για την παραγωγή PHB, καθώς αναπτύσσεται γρήγορα και συσσωρεύει το βιοπολυμερές με αυτοκαταλυτικό τρόπο [7]. Τα κύτταρα του διατηρήθηκαν σε αποθέματα γλυκερόλης που προετοιμάστηκαν από φρέσκες καλλιέργειες (στο μέσο της εκθετικής φάσης). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε χημικά προκαθορισμένο μέσο καλλιέργειας (AL). Η σύσταση του μέσου καλλιέργειας ποίκιλλε ανάλογα με την κλίμακα της καλλιέργειας (κωνικές φιάλες ή βιοαντιδραστήρας) και περιείχε (ανά λίτρο): 20 g λακτόζης από τυρόγαλα, 1-3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,36-3,6 g KH_2PO_4 , 2,14-21,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g (σε κλίμακα φιάλης) ή 13 g (σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g (σε κλίμακα φιάλης) ή 0,1 g (σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g κιτρικού οξέος και 1 ml (σε κλίμακα φιάλης) ή 33 ml (σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα) διαλύματος ιχνοστοιχείων. Το διάλυμα ιχνοστοιχείων περιείχε (ανά λίτρο υδατικού διαλύματος 1 N HCl): 20 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g H_3BO_3 , 0,2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 0,01 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Η σύσταση του μέσου τροφοδοσίας (AL*), που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ημι-συνεχούς τροφοδοσίας ήταν πανομοιότυπη με αυτή του πρότυπου μέσου AL, αλλά απαλλαγμένη από οποιαδήποτε πηγή αζώτου. Σημειώνεται ότι το μέσο AL* περιείχε (ανά λίτρο): 1,5 g KH_2PO_4 και 10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ και τροφοδοτήθηκε στη φιάλη ή στον βιοαντιδραστήρα ακολουθώντας πολιτική προσθήκης σε ένα ή δύο στάδια. Το μέσο καλλιέργειας AL** που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα συνεχούς τροφοδοσίας περιείχε (ανά λίτρο): 600 g λακτόζης, 112,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 26,66 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,66 g κιτρικού οξέος και 26,66 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων. Η ζύμωση του βακτηρίου και οι αναλυτικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται από τους Penloglou et al. [4]. Σημειώνεται ότι οι αρχικές συχνότητες ανακίνησης του επωαστήρα ρυθμίστηκαν στις 170, 190, 210, 230 και 250 rpm, ανάλογα την επιθυμητή συγκέντρωση D.O. στην καλλιέργεια.

Για τη διάσπαση των κυττάρων και την επακόλουθη εκχύλιση του ενδοκυτταρικού συσσωρευμένου PHB εφαρμόστηκε μία μηχανική-χημική συνδυαστική διεργασία [8]. Η κατανομή μοριακού βάρους (MWD) του PHB καθώς και οι αντίστοιχες τιμές του μέσου κατά αριθμό μοριακού βάρους (M_n), του μέσου κατά βάρους μοριακού βάρους (M_w) και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) μετρήθηκαν με χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (GPC). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος GPC της εταιρίας PolymerLabs, εξοπλισμένος με ιξωδόμετρο (μοντέλο Viscotek 210) και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασης των βασικών παραμέτρων ζύμωσης (αρχική σύσταση του μέσου καλλιέργειας AL, συγκέντρωση D.O.) και της επιλεγμένης στρατηγικής λειτουργίας (χρόνος συγκομιδής, ασυνεχής ή ημι-συνεχής λειτουργία και προσθήκη θρεπτικών συστατικών) στη συσσώρευση του PHB και στην κατανομή του μοριακού του βάρους (MWD). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων. Συγκεκριμένα, οι επιδράσεις της αρχικής σύστασης του μέσου καλλιέργειας στη συγκέντρωση βιομάζας, στην ποσοστιαία περιεκτικότητα PHB στην ξηρή βιομάζα και στις τιμές των M_n και M_w του PHB παρουσιάζονται με βάση τις διαφορετικές τιμές των αρχικών αναλογιών μάζας άνθρακα/αζώτου (C/N) και άνθρακα/φωσφόρου (C/P). Ομοίως, παρουσιάζονται οι επιδράσεις του D.O. και του χρόνου παραμονής των κυττάρων στη στατική φάση (ορίζεται επίσης ως χρόνος συγκομιδής) στα παραπάνω μεγέθη. Αξίζει να σημειωθεί πως τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κλίμακα κωνικών φιαλών.

Πίνακας 1. Επίδραση των αρχικών λόγων μάζας (C/N) και (C/P), της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου (D.O.) και του χρόνου συγκομιδής (του χρόνου παραμονής στη στατική φάση) στην αύξηση της βιομάζας, στη συσσώρευση PHB και στα μέσα μοριακά του βάρη.

Μέγεθος	Τιμή	DCW ^α (g/l)	%PHB ^β (% g/g)	M _n ^γ (×10 ³ g/mol)	M _w ^δ (×10 ³ g/mol)
Αναλογία μάζας (C/N) ^ε (g/g)	6,6	1,33	25	78	117
	8	1,87	35	317	596
	10	1,82	46	517	894
	13,3	1,88	37	944	1601
	20	1,10	15	1085	2576
Αναλογία μάζας (C/P) ^{στ} (g/g)	0,8	1,44	43	320	650
	1,9	1,82	46	517	894
	3	1,87	43,5	602	1151
	5	1,94	38	844	1401
	8	1,99	27	885	2076
Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (D.O.) ^ζ (% g/g)	5	1,03	25	1075	2035
	15	1,47	43	585	1011
	20	1,82	46	517	894
	25	1,98	37	357	653
	30	2,05	35	335	635
Χρόνος συγκομιδής (t _{rs}) ^η (h)	0	1,84	38	651	1576
	1	1,82	46	517	894
	3	1,72	44	357	784
	9	1,87	38	256	560
	20	1,79	33	118	481

^αΣυγκέντρωση βιομάζας ως βάρος ξηρών κυττάρων (DCW). ^βΠοσοστιαίο περιεχόμενο PHB στην ξηρή μάζα κυττάρων.

^γΜέσο κατά αριθμό μοριακό βάρος (M_n). ^δΜέσο κατά βάρος μοριακό βάρος (M_w). ^εΓια (C/P)=1,9 g/g, D.O.=20% και t_{rs}=1 h. ^{στ}Για (C/N)=10 g/g, D.O.=20% και t_{rs}=1 h. ^ζΓια (C/N)=10 g/g, (C/P)=1,9 g/g και t_{rs}=1 h. ^ηΓια (C/N)=10 g/g, (C/P)=1,9 g/g και D.O.=20%.

Παρατηρείται ότι για τις τιμές των αρχικών λόγων μάζας (C/N) και (C/P) ίσες με 10 g/g και 1,9 g/g, αντίστοιχα, η τελική περιεκτικότητα της βιομάζας σε PHB παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της (46% της συνολικής βιομάζας, τιμή που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση PHB 1,82 g/l). Αντίστοιχα, από τις τιμές των M_n και M_w παρατηρείται ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις των αμμωνιακών και φωσφορικών αλάτων στο μέσο καλλιέργειας επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη του μοριακού βάρους του PHB. Όσον αφορά την επίδραση του D.O., είναι φανερό ότι για συγκέντρωση του ίση με 20% της αντίστοιχης συγκέντρωσης κορεσμού, η περιεκτικότητα PHB στα κύτταρα παρουσίασε μέγιστη τιμή ίση με 46% g/g της συνολικής βιομάζας. Αντίθετα οι τιμές των M_n και M_w μειώνονται συνεχώς καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του D.O. Για χαμηλές τιμές D.O. (υπό συνθήκες χαμηλής ανάπτυξης βιομάζας), οι τιμές των M_n και M_w του PHB ήταν υψηλές (1,075×10⁶ και 2,035×10⁶ g/mol, αντίστοιχα). Ωστόσο, όταν οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου, λόγω υψηλότερης συχνότητας ανακίνησης του επωαστήρα, οι τιμές των M_n και M_w μειώθηκαν σε 3,35×10⁵ και 6,35×10⁵ g/mol, αντίστοιχα. Αυτό υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση του D.O. επηρεάζει την αύξηση του μεγέθους των πολυμερικών αλυσίδων του PHB, ενώ αντίθετα δεν επηρεάζει τη μορφή της κατανομής μοριακού βάρους του PHB, η οποία παραμένει σχετικά στενή. Τέλος, αναφορικά με την επίδραση του χρόνου συγκομιδής των κυττάρων, η περιεκτικότητα PHB στα κύτταρα έλαβε τη μέγιστη τιμή της για χρόνο παραμονής ίσο με 1 h. Ωστόσο, για μεγαλύτερους χρόνους παραμονής η περιεκτικότητα άρχισε να μειώνεται λόγω αντιδράσεων αποικοδόμησης του πολυμερούς. Αυτό φανερώνει ότι τα βακτηριακά κύτταρα άρχισαν να καταναλώνουν το συσσωρευμένο βιοπολυμερές ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω από τη σημαντική μείωση των τιμών των M_n και M_w. Έτσι, όσο η καλλιέργεια παρέμενε στη στατική φάση, τόσο υψηλότερη ήταν η παρατηρούμενη μείωση των τιμών M_n και M_w (για χρόνο παραμονής ίσο με 0 h, οι τιμές των M_n και M_w ήταν 6,51×10⁵ και 1,576×10⁶ g/mol, αντίστοιχα,

ενώ για χρόνο παραμονής ίσο με 20 h οι αντίστοιχες τιμές ήταν $1,18 \times 10^5$ και $4,81 \times 10^5$ g/mol). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι ο χρόνος συγκομιδής είναι μια λειτουργική παράμετρος της διεργασίας που επηρεάζει σημαντικά τόσο την ποσότητα του βιοπολυμερούς όσο και το μοριακό του βάρος.

Στη συνέχεια, η επίδραση της στρατηγικής λειτουργίας της καλλιέργειας (ασυνεχής ή ημι-συνεχής λειτουργία), καθώς και της πολιτικής προσθήκης θρεπτικού μέσου (σε ένα ή δύο στάδια, ή συνεχής προσθήκη) στην κατανομή μοριακού βάρους του PHB μελετήθηκε σε κλίμακα εργαστηριακού βιοαντιδραστήρα. Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες ζύμωσης (Πίνακας 2). Η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου ρυθμίστηκε στο 20% της αντίστοιχης συγκέντρωσης κορεσμού με μόνη εξαίρεση την περίπτωση της ασυνεχούς τροφοδοσίας δύο σταδίων (TB), όπως εξηγείται παρακάτω. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι ακόλουθες πολιτικές καλλιέργειας:

(SB): Πολιτική ασυνεχούς λειτουργίας σε ένα στάδιο υπό τις επιλεγμένες συνθήκες καλλιέργειας.

Ο συνολικός χρόνος καλλιέργειας ήταν ίσος με 8 h.

(TB): Πολιτική ασυνεχούς λειτουργίας σε δύο στάδια, όπου η συγκέντρωση D.O. ρυθμίστηκε στο 5% της αντίστοιχης συγκέντρωσης κορεσμού κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου καλλιέργειας των κυττάρων (για περίπου 20 h). Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου (μετά από τις πρώτες 20 h καλλιέργειας) η συγκέντρωση D.O. ρυθμίστηκε στην τιμή 20%.

(SS): Πολιτική ημι-συνεχούς τροφοδοσίας ενός σταδίου με την προσθήκη 800 ml μέσου καλλιέργειας AL*, περίπου 5 h μετά την έναρξη της εκθετικής φάσης και τον σχηματισμό επαρκούς ποσότητας υπολειμματικής βιομάζας. Ο συνολικός χρόνος καλλιέργειας ήταν ίσος με 24 h.

(TS): Πολιτική ημι-συνεχούς τροφοδοσίας δύο σταδίων με την προσθήκη 400 ml μέσου καλλιέργειας AL* σε δύο διαφορετικούς χρόνους, συγκεκριμένα σε 2 και 5 h μετά την έναρξη της εκθετικής φάσης. Ο συνολικός χρόνος καλλιέργειας ήταν ίσος με 24 h.

(CF): Πολιτική συνεχούς τροφοδοσίας μέσου καλλιέργειας AL**, χρησιμοποιώντας ένα σταθερό ρυθμό τροφοδοσίας 10 ml/h από τις 5 h μέχρι το τέλος της καλλιέργειας. Ο συνολικός χρόνος καλλιέργειας ήταν ίσος με 28 h.

Πίνακας 2. Επίδραση των διαφορετικών στρατηγικών καλλιέργειας στην αύξηση της βιομάζας, τη συσσώρευση PHB και στα μέσα μοριακά του βάρη.

Στρατηγική Τροφοδοσίας ^α	DCW ^β (g/l)	%PHA ^γ (% g/g)	M _n ^δ ($\times 10^3$ g/mol)	M _w ^ε ($\times 10^3$ g/mol)
Ασυνεχής ενός σταδίου, SB	2,75	55	520	1112
Ασυνεχής δύο σταδίων, TB	8,80	77	360	780
Ημι-συνεχής ενός σταδίου, SS	12,46	95	201	411
Ημι-συνεχής δύο σταδίων, TS	11,84	94	198	401
Συνεχής, CF	21,22	75	491	1100

^αΑρχικές συνθήκες: (C/N)=10 g/g, (C/P)=1,9 g/g, D.O.=2% και $t_{rs}=1$ h. ^βΣυγκέντρωση βιομάζας ως βάρος ξηρών κυττάρων (DCW) ^γΠοσοστιαίο περιεχόμενο PHB στην ξηρή μάζα κυττάρων. ^δΜέσο κατά αριθμό μοριακό βάρος (M_n). ^εΜέσο κατά βάρος μοριακό βάρος (M_w)

Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται οι επιδράσεις των διαφορετικών στρατηγικών λειτουργίας στη βιομάζα, στην περιεκτικότητα σε PHB και στα μέσα μοριακά του βάρη. Παρατηρείται ότι με τη στρατηγική SB οι μέγιστες τιμές των M_n και M_w ήταν $5,2 \times 10^5$ και $1,112 \times 10^6$ g/mol, αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές είναι παρόμοιες με εκείνες που καταγράφηκαν στα αντίστοιχα πειράματα σε κλίμακα κωνικών φιαλών (Πίνακας 1). Ωστόσο, στα πειράματα σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα, λόγω του καλύτερου ελέγχου των συνθηκών καλλιέργειας, παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του μοριακού βάρους του PHB, όσο και της συγκέντρωσης βιομάζας και της περιεκτικότητας PHB. Με την εφαρμογή της στρατηγικής TB, οι περιορισμένες συνθήκες ανάπτυξης καλλιέργειας στο πρώτο στάδιο οδήγησαν σε πολύ υψηλές τιμές για τα M_n και M_w ($1,2 \times 10^6$ και $2,3 \times 10^6$ g/mol, αντίστοιχα)

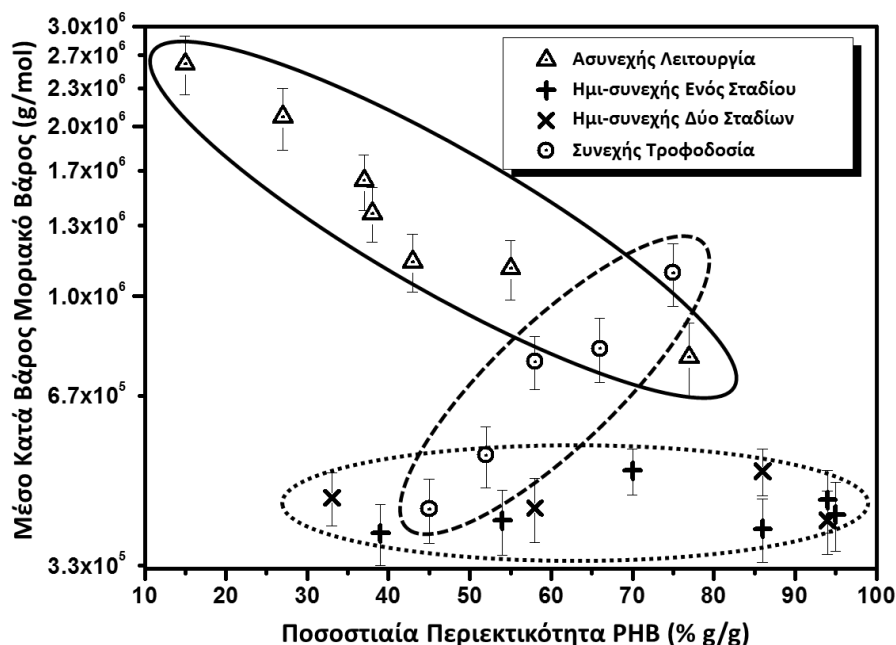
και σε χαμηλές τιμές για τη συγκέντρωση βιομάζας και τη περιεκτικότητα σε PHB. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου, οι νέες συνθήκες καλλιέργειας είχαν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευση PHB σε βάρος όμως των M_n και M_w , οι τιμές των οποίων ήταν χαμηλότερες ($3,6 \times 10^5$ και $7,8 \times 10^5$ g/mol, αντίστοιχα). Με την εφαρμογή των στρατηγικών SS και TS, η συσσώρευση PHB στα κύτταρα ενισχύθηκε λόγω της εφαρμογής συνθηκών περιορισμένου αζώτου, αμέσως μετά το στάδιο της τροφοδοσίας. Και στις δύο περιπτώσεις, ο μεταβολισμός του άνθρακα κατευθύνθηκε κυρίως προς την παραγωγή PHB, έχοντας ως αποτέλεσμα πολύ υψηλές αποδόσεις (95% και 94% g/g, αντίστοιχα). Ωστόσο, ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης βιοπολυμερούς οδήγησε σε μείωση του μοριακού του βάρους. Είναι προφανές ότι αμφότερες οι στρατηγικές είχαν σαν αποτέλεσμα παρόμοια απόδοση καλλιέργειας και οι τελικές τιμές των μοριακών βαρών ήταν σημαντικά μειωμένες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες που επιτεύχθηκαν από τις προηγούμενες στρατηγικές (ασυνεχούς) λειτουργίας. Εφαρμόζοντας την πολιτική CF, η ανάπτυξη της καλλιέργειας ήταν καλά ισορροπημένη ως προς τη συσσώρευση PHB και την συνολική εξέλιξη του μοριακού βάρους. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, οι τελικές τιμές των M_n και M_w ($4,91 \times 10^5$ και $1,1 \times 10^6$ g/mol, αντίστοιχα) είναι συγκρίσιμες με εκείνες που επιτυγχάνονται με την στρατηγική SB, ενώ η συνολική συγκέντρωση βιομάζας αυξήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με εκείνη που προκύπτει από τις στρατηγικές ημι-συνεχούς τροφοδοσίας. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στο πλαίσιο της στρατηγικής CF μπορούν να εξηγηθούν από τη συνεχή τροφοδοσία του πλούσιου σε άζωτο μέσου τροφοδοσίας AL**, που έχει ως αποτέλεσμα τη σχεδόν σταθερή τιμή της αναλογίας μάζας (C/N) στο μέσο καλλιέργειας.

Τέλος, στο Σχήμα 1 απεικονίζεται η επίδραση των διαφορετικών στρατηγικών λειτουργίας στο μέσο κατά βάρος μοριακό βάρος του PHB και στην ποσοστιαία περιεκτικότητα του στα κύτταρα. Παρατηρούνται με σαφήνεια τρεις περιοχές λειτουργίας σε σχέση με την περιεκτικότητα και την τελική τιμή του M_w , ανάλογα με τη στρατηγική λειτουργίας και την πολιτική προσθήκης θρεπτικών ουσιών. Η εφαρμογή στρατηγικής ασυνεχούς λειτουργίας οδήγησε σε πολύ χαμηλό ρυθμό συσσώρευσης PHB (τελική περιεκτικότητα ίση με 15% g/g), επιτεύχθηκε όμως το μέγιστο M_w ($2,576 \times 10^6$ g/mol). Η τροποποίηση των συνθηκών καλλιέργειας ώστε να προκύψει ένας υψηλότερος ρυθμός συσσώρευσης PHB, οδήγησε σε μείωση του M_w . Με την εφαρμογή στρατηγικής ημι-συνεχούς τροφοδοσίας, με προσθήκη θρεπτικών ουσιών είτε σε ένα είτε σε δύο στάδια, το M_w επηρεάστηκε από το ρυθμό συσσώρευσης PHB και κυμάνθηκε από $3,9 \times 10^5$ έως $4,9 \times 10^5$ g/mol για περιεκτικότητα PHB μεταξύ 33% έως 95% g/g. Εφαρμόζοντας τη στρατηγική συνεχούς τροφοδοσίας, το M_w αυξήθηκε προοδευτικά από $4,2 \times 10^5$ σε $1,11 \times 10^6$ g/mol και η περιεκτικότητα PHB στα κύτταρα αυξήθηκε από 45% σε 75% g/g. Αυτό οφείλεται στην ταυτόχρονη συσσώρευση βιοπολυμερούς από τα κύτταρα παράλληλα με την ανάπτυξη της βιομάζας, όταν υπάρχει επαρκής συγκέντρωση αζώτου στο μέσο καλλιέργειας. Παρατηρείται επίσης ότι η σχέση μεταξύ του M_w και της περιεκτικότητας του PHB στα κύτταρα του *A. lata* ήταν σε όλες τις περιπτώσεις πρακτικά γραμμική.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη παρέχει μια περιεκτική ανάλυση σχετικά με την επίδραση βασικών παραμέτρων της διεργασίας καλλιέργειας του βακτηρίου *A. lata* στην παραγωγικότητα, στην απόδοση και στην κατανομή του μοριακού βάρους του βιοπολυμερούς PHB. Αποδεικνύεται ότι με την επιλογή κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας (δηλαδή τις στρατηγικές προσθήκης θρεπτικών ουσιών και τροφοδοσίας) μπορούν να παραχθούν δείγματα PHB με ελεγχόμενες μοριακές ιδιότητες. Υπό συνθήκες χαμηλής ανάπτυξης βιομάζας και συσσώρευσης βιοπολυμερούς, το μοριακό του βάρος είναι πολύ υψηλό. Κατά κανόνα, στα βακτήρια που παράγουν βιοπολυμερή κατά την ανάπτυξη τους, όπως ακριβώς το *A. lata*, αυτή η συμπεριφορά αποδίδεται στο γεγονός ότι η συσσώρευση PHB και η αύξηση του μοριακού του βάρους είναι δύο ανταγωνιστικοί μηχανισμοί. Από την άλλη πλευρά, υπό ταχείες συνθήκες ανάπτυξης της βιομάζας και σχηματισμού ενδοκυτταρικών κόκκων

βιοπολυμερούς, το μοριακό του βάρος μειώνεται. Επιπλέον, κάτω από συνθήκες περιορισμένης συσσώρευσης πολυμερούς, το μοριακό βάρος του PHB μπορεί να είναι εξαιρετικά υψηλό. Τέλος, αποδεικνύεται ότι με την εφαρμογή της στρατηγικής συνεχούς προσθήκης θρεπτικών συστατικών που εξισορροπεί τους δύο ανταγωνιστικούς μηχανισμούς, μπορούν να επιτευχθούν τόσο υψηλές παραγωγικότητες όσο και υψηλά μοριακά βάρη PHB.



Σχήμα 1. Εξάρτηση του μέσου κατά βάρος μοριακού βάρους του PHB από την ποσοστιαία περιεκτικότητα του βιοπολυμερούς στα κύτταρα υπό στρατηγικές ασυνεχούς, ημι-συνεχούς και συνεχούς λειτουργίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Βιομετατροπή Αποβλήτων Βιομηχανίας Τροφίμων σε Βιοπολυμερή για Προϊόντα Συσκευασίας στα Πλαίσια ενός Βιοδυλιστηρίου – Wastes-to-Biopolymers», και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ 2014-2020), Δράση ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ (κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-02822).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L.L. Madison, G.W. Huisman. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1999) 21–53.
- [2] W. Babel, J.U. Ackermann, U. Breuer. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 71 (2001) 125–157.
- [3] S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 233–247.
- [4] G. Penloglou, E. Kretza, C. Chatzidoukas, S. Parouti, C. Kiparissides. *Biochem. Eng. J.* 62 (2012) 39–47.
- [5] G. Penloglou, C. Chatzidoukas, C. Kiparissides. *Biotechnol. Adv.* 30 (2011) 329–337.
- [6] C. Chatzidoukas, G. Penloglou, C. Kiparissides. *Biochem. Eng. J.* 71 (2013) 72–80.
- [7] G. Braunegg, R. Bona, M. Koller. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 43 (2004) 1779–1793.
- [8] I.M. Tamer, M. Moo-Young, Y. Chisti. *Bioprocess. Eng.* 19 (1998) 459–468.